PROTISTOLOGICA. 1969. T. V, fasc. 2.

ÉTUDE CYTOPHOTOMÉTRIQUE DES TENEURS EN ADN DES MICRONUCLEUS DE *PARAMECIUM CAUDATUM* AU COURS DE LA CONJUGAISON ET PENDANT LA DIFFÉRENCIATION DES "ANLAGES" EN MACRONUCLÉUS

Janine DUPY-BLANC

Laboratoire associé C.N.R.S. n° 138
1, avenue Vercingétorix, Clermont-Ferrand

RÉSUMÉ

Par des dosages cytophotométriques, nous avons déterminé les variations des quantités d'ADN de l'appareil nucléaire de *Paramecium caudatum* au cours des différents stades de la conjugaison et jusqu'à la transformation définitive des anlages en macronucleus. De cette étude, nous avons observé les résultats suivants :

— En début de conjugaison, les micronucleus sont en phase de repos G1, donc la teneur est diploïde.
— Au cours des 2 premières divisions prégamiques, on obtient le rapport 4:2:1. La méiose a bien lieu au cours de la 2e division prégamique.
— A la 3e division prégamique, il y a augmentation du taux d'ADN et on a le rapport 1:2:1.
— Les corpuscules issus des 3 divisions successives du syncaryon se comportent comme des mi. On a le rapport 4:2.
— 4 corpuscules se différencient en anlages à partir d'un stade diploïde, après une longue période de repos qui varie suivant la température et le milieu.
— La différenciation des anlages en futurs Mn se ferait en 2 phases : *chez les exconjugants,* 1 phase de polyploïdisation par augmentation de valeurs haploïdes, *chez les exconjugants-fils :* une 2e phase de polyploïdisation; il y aurait acquisition définitive du taux d'ADN du futur Mn par doublement de la valeur initiale.

SUMMARY

Through cytophotometric quantitative analyses we have determined the variations in the amount of DNA contained in the nuclear apparatus of *Paramecium caudatum* during the different stages of the conjugation and until the final transformation of the anlages into macronucleus. From that study, we have drawn the following conclusions :

— At the beginning of the conjugation, the micronucleus are in the phase of rest G1, so the amount is diploidic.
— In the course of the first two pregamic divisions, we get the proportion 4:2:1. The meiosis does take place during the 2nd pregamic division.
— At the 3rd pregamic division, there is an increase in the amount of DNA and we get the proportion 1:2:1.
— The corpuscules proceeding from the 3 successive divisions of the syncaryon act like micronucleus we get the proportion 4:2.
— Four corpuscules are transformed into anlages after a diploidic stage, followed by a long period of rest which varies according to the temperature and environment.
— The transformation of the anlages into future macronucleus would be achieved in two stages : in the exconjugants, the first stage of polyploidisation, due to the increase of haploidic values; in the exconjugant-sous, the second stage of polyploidisation there would be definitive acquisition of the amount of DNA contained in the future macronuclei by a doubling of the initial value.

1969

* Manuscrit reçu le 4 avril 1969.

INTRODUCTION

Pendant la conjugaison des Ciliés, le macronucleus disparaît et le micronucleus, après avoir subi la méiose, se divise en un pronucleus ♂ et un pronucleus ♀. Il y a échange des noyaux migrateurs et, dans chaque partenaire, se forme un syncaryon. Celui-ci se divise trois fois de suite chez *Paramecium caudatum* et, des huit corpuscules ainsi formés, un seul donnera un futur micronucleus diploïde, tandis qu'à partir de 4 autres (désignés sous le nom d'anlage lors de leur différenciation) apparaîtront, par augmentation de la teneur en ADN, 4 futurs macronucleus polyploïdes. Ils seront répartis, chacun à un individu au cours des 2 divisions cellulaires successives qui suivent les phénomènes nucléaires de la conjugaison.

L'étude des variations des quantités d'ADN qui se produisent au cours des divisions prégamiques n'a été envisagée que chez *Stylonychia pustulata* par J. Pieri (1965). Il observe au cours de la méiose le rapport 4 : 2 : 1, rapport identique à celui déterminé chez les Métazoaires, pendant la spermatogénèse ou l'ovogénèse, entre les « cytes » de premier ordre, les « cytes » de second ordre et les « tides ».

Le développement des anlages de même n'a été décrit que chez des Hypotriches. Chez *Stylonychia mytilus,* Ammermann met en évidence, par un analyse spectrophotométrique (1965), puis autoradiographique (1968), 2 phases de polyploïdisation. Pendant la première phase, l'anlage macronucléaire augmente d'environ 16 fois sa teneur en ADN. Un fait étonnant succède alors à cette première phase : il y a perte de l'ADN qui vient d'être synthétisé et l'anlage redevient diploïde. A cette phase, désignée par Ammermann sous le nom de « phase pauvre en ADN », fait suite une deuxième phase de polyploïdisation : l'ADN de l'anlage double 5 fois et le développement du macronucleus est achevé lors de la première division cellulaire, après la conjugaison. Cependant, Rao (1968) n'observe pas ces deux phases chez *Euplotes woodruffi.*

L'étude du macronucleus chez *Paramecium caudatum* a déjà fait l'objet de quelques observations par la méthode cytophotométrique (Blanc J. 1968). Nous avons complété nos recherches par l'étude des phénomènes nucléaires au cours de la conjugaison, c'est-à-dire par l'analyse des noyaux jusqu'à la formation du syncaryon, puis au-delà, au cours des divisions post-zygotiques et pendant la transformation des anlages en macronucleus.

Matériel.

Comme dans nos précédents travaux (Blanc J. 1968), nous avons utilisé des Paramécies appartenant aux mating-types V et VI du syngen 3 ; selon nos techniques habituelles (Blanc J. 1965), les Infusoires sont fixés, colorés au Feulgen, avec fuschine « Harleco » et examinés au cytophotomètre Leitz.

Nous rappelons brièvement les différents stades de la conjugaison chez *Paramecium caudatum* ainsi que leurs caractéristiques, en vue d'y rapporter les dosages cytophotométriques (fig. 1).

Ce sont :

Stade 1 a : formation des couples. Dans chaque conjugant, le micronucleus est encore situé contre le macronucleus.

Stade 1 b : le micronucleus gonflé est éloigné du macronucleus.

Stade 2 : la première division prézygotique aboutit à la formation de 2 micronucleus.

Stade 3 : la deuxième division prézygotique donne 4 micronucleus.

Stade 4 : un micronucleus continue à évoluer. Les 3 autres dégénèrent.

Stade 5 : la troisième division prézygotique produit dans chaque conjugant les 2 noyaux gamétiques (pronucleus ♂ et pronucleus ♀).

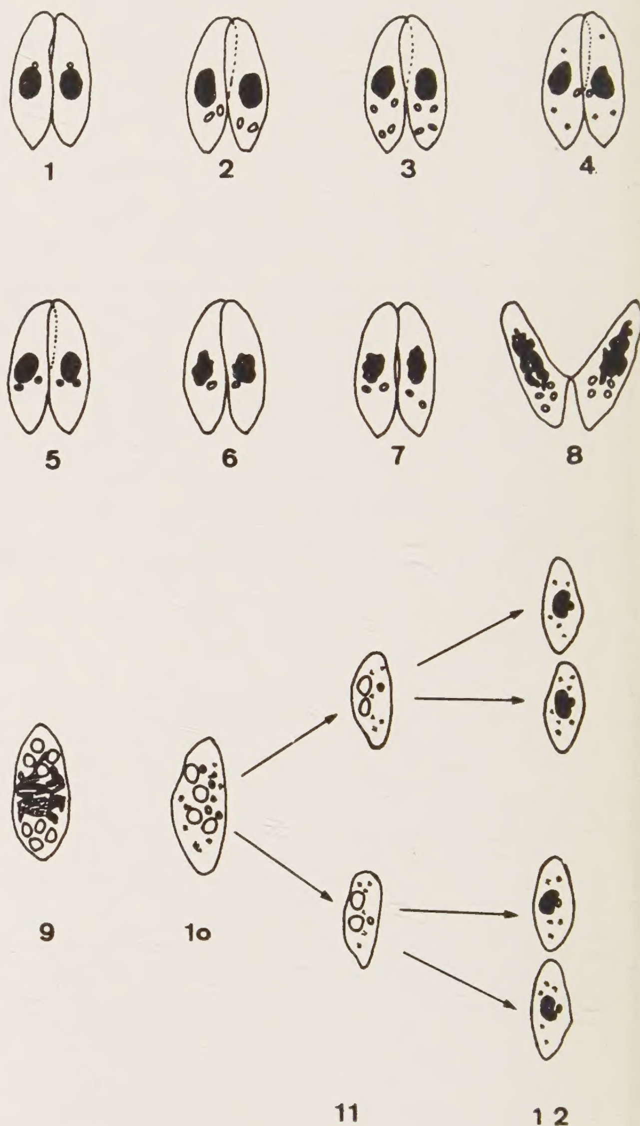


Fig. 1

UNIV. LEIDEN BIBL.

Stade 6 : échange des pronucleus.
Le pronucleus ♂ rencontre le pronucleus ♀. Ils entrent en contact par leur extrémité postérieure et la fusion progresse d'arrière en avant, formant ainsi le syncaryon ou noyau de fécondation (caryogamie).

Stade 7 : première division postzygotique. Les conjugants commencent à se séparer.

Stade 8 : la deuxième division postzygotique forme 4 corpuscules dans chacun des exconjugants.

Stade 9 : la troisième division postzygotique aboutit à l'apparition de 8 corpuscules.

Stade 10 : 3 corpuscules dégénèrent ; 4 gonflent et se différencient : ce sont les anlages (An) ; le noyau restant se divise en 2 noyaux-fils ; la cytodiérèse se réalisant, chacun devient le micronucleus d'un exconjugant-fils.

Stade 11 : exconjugants-fils avec 2 anlages.

Stade 12 : exconjugants-petits-fils avec 1 anlage qui est l'équivalent du futur macronucleus.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Etudes des micronucleus du début de la conjugaison à la formation du syncaryon.

Stade 1 a : comme l'indique l'histogramme I a, de la figure 2, 76 % des micronucleus ont des teneurs en ADN comprises entre 30 et 35 u.a. Aucune valeur ni en phase de synthèse ni tétraploïde n'est observée. La moyenne de 35 micronucleus dosée est de 32 u.a.

En conséquence, seules les Paramécies dont les micronoyaux se trouveraient dans la phase de repos G1 pourraient conjuguer. Lors du mélange des 2 mating-types complémentaires, tous les Infusoires se trouvant dans la période située de la fin de la bipartition aux 3/4 de l'interphase peuvent présenter de réactivité sexuelle.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour les macronucleus lors de la formation des couples (Blanc J. 1968).

Stade 1 b : les teneurs en ADN des micronucleus s'échelonnent entre 30 et 72 u.a. (histogramme I b, fig. 2). On observe seulement 3 % de valeurs diploïdes. Les autres sont en période de synthèse ou en phase G_2.

La duplication de l'ADN dans les micronucleus a donc lieu entre les 2 stades 1 a et 1 b.

Stade 2 : le micronucleus subit sa première division prézygotique : 75 % des mesures ont des teneurs en ADN comprises entre 30 et 35 u. a. (Fig. 2, histogramme II). Pour les 24 micronucleus dosés, la moyenne calculée est de 33 u. a., valeur qui doit être considérée comme diploïde.

Stade 3 : le micronucleus se divise une deuxième fois, donnant ainsi 4 micronucleus par cellule. Leur teneur en ADN varie de 15 à 25 u. a. (Fig. 2, histogramme III) dans 85 % des cas.

La moyenne des 52 mesures effectuées est de 17 u. a.

Ce chiffre correspond approximativement à la moitié des valeurs observées au stade 2 et au quart des valeurs maximales du stade 1 b. Ceci confirme le phénomène classique de la méiose, et plus praticulièrement le fait génétiquement démontré que les 4 micronoyaux issus de la deuxième division prézygotique sont haploïdes.

Nous venons donc de vérifier par des dosages cytophotométriques que la deuxième division prézygotique des micronoyaux est bien réductionnelle et que la méiose se termine pendant le stade 3.

Stade 4 : 3 des 4 micronucleus provenant de la deuxième division prézygotique dégénèrent. Le noyau restant a été photométré avant sa transformation ultérieure pour donner les pronucleus. Les quantités d'ADN observées, pour 31 dosages, sont comprises entre 15 et 35 u. a. (Fig. 2, histogramme IV). Au cours de ce stade, le micronucleus synthétise une quantité d'ADN atteignant les valeurs doubles de celles considérées comme haploïdes (stade 3 : 17 u. a.), préparant ainsi sa troisième division prézygotique.

Stade 5 : à ce stade, chaque cellule contient le noyau stationnaire et le noyau migrateur. Nous avons photométré 52 pronucleus ♂ et ♀. Les teneurs ADN varient de 14 à 23 u. a. et 90 % sont comprises entre 15 et 20 u. a., comme l'indique l'histogramme V de la fig. 2. La moyenne est de 17,3 u. a.

Les noyaux gamètes sont eux aussi évidemment haploïdes.

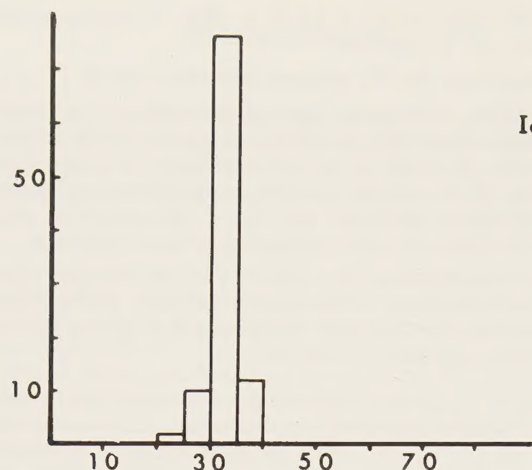
Stade 6 : le syncaryon formé par caryogamie commence très tôt à synthétiser de l'ADN ; il se divise 1 heure plus tard. Ceci explique pourquoi, dans l'histogramme VI de la figure 2 on observe peu de valeurs diploïdes (14 %) ; la phase de synthèse de l'ADN est commencée et parfois la duplication s'achève.

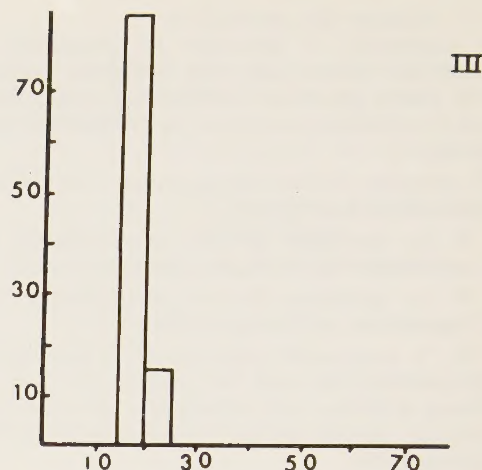
2. Etude des corpuscules.

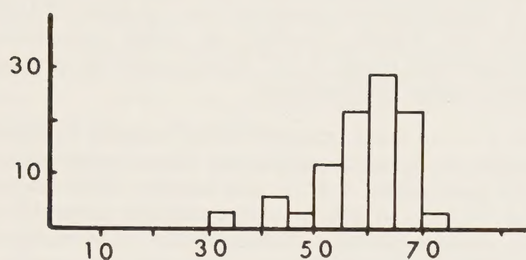
Stade 7 : c'est la première division postzygotique. Le syncaryon se divise et les conjugants se séparent. Les teneurs en ADN observées sur 31 corpuscules s'échelonnent entre les 2 limites des valeurs diploïdes et tétraploïdes (Fig. 3, I).

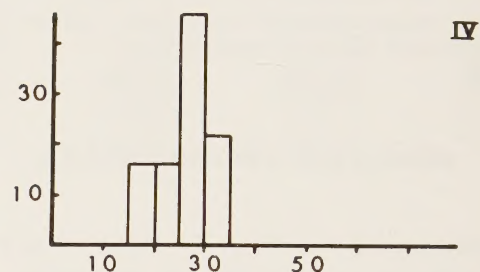
Stade 8 : les 2 corpuscules issus du syncaryon se sont divisés donnant naissance à 4 corpuscules. L'histogramme II de la Fig. 3 montre que les quantités d'ADN des mesures effectuées sont du même ordre de grandeur qu'au stade précédent. Les corpuscules issus des 2 premières divisions postzygotiques se comportent comme des micronoyaux d'une culture normale.

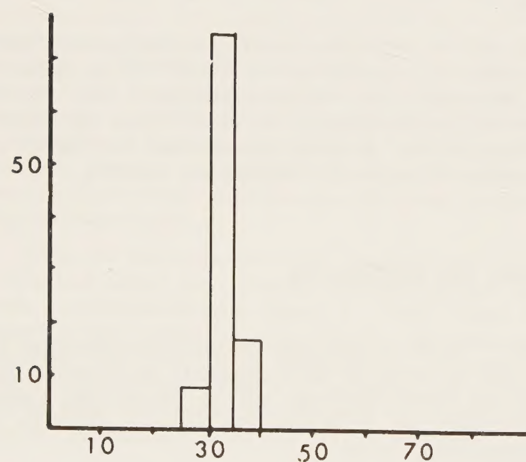
Stade 9 : la troisième division postzygotique donne 8 corpuscules. A ce stade, 74 corpuscules ont été dosés, 92 % des teneurs en ADN sont comprises entre 30 et 40 u. a. (histogramme III, fig. 3) et la quantité moyenne

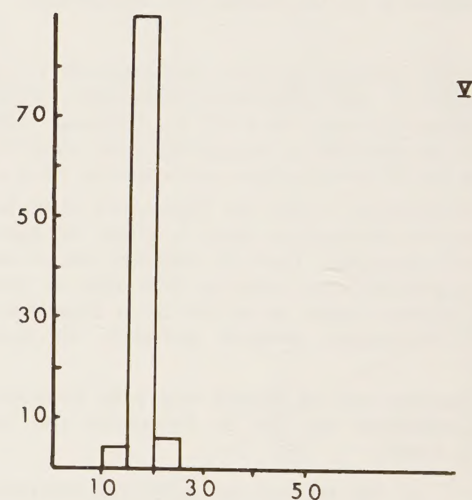












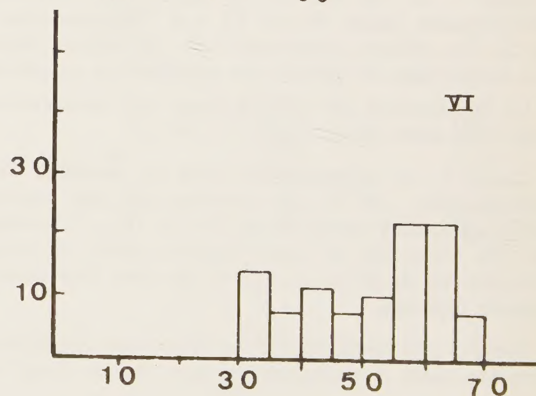


Fig. 2. — Détermination de la teneur en ADN des micronoyaux au cours du premier stade de la conjugaison, c'est-à-dire du stade I au stade VI.

Histogramme I a : Stade I a (nombre de mesures : 35). *Histogramme I b :* Stade I b (nombre de mesures : 32). *Histogramme II :* Stade II (nombre de mesures : 34). *Histogramme III :* Stade 3 (nombre de mesures : 52). *Histogramme IV :* Stade 4 (nombre de mesures : 31). *Histogramme V :* Stade 5 (nombre de mesures : 52). *Histogramme VI :* Stade VI (nombre de mesures : 28).

En abcisses : la teneur en ADN par noyau (soit les mi, soit les c, soit les An) exprimée en unités arbitraires (u. a.).

En ordonnées : la fréquence des teneurs de ces différentes classes exprimée en % du nombre de noyaux mesurés.

d'ADN obtenue pour l'ensemble des 74 dosages est de 34 u. a.

En conclusion, on peut affirmer que tous les corpuscules à ce stade renferment une quantité égale d'ADN, quantité qui correspond aux teneurs diploïdes des micronucleus.

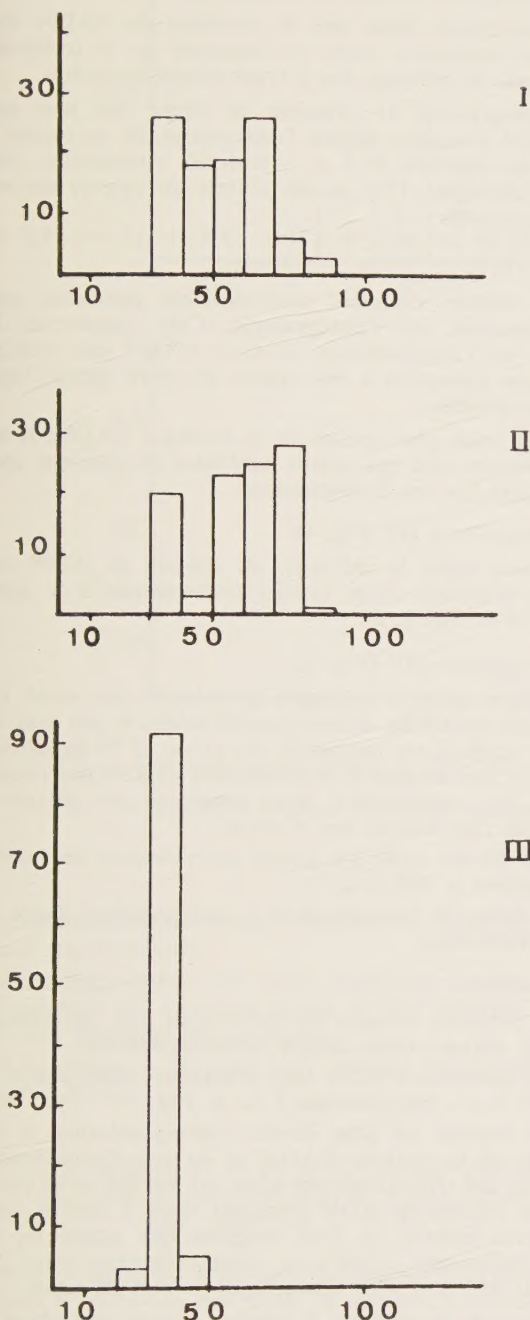


Fig. 3. — Détermination de la teneur en ADN des corpuscules au cours des 3 divisions postzygotiques :
Histogramme I : Stade VII à 2 c. (nombre de mesures : 31).
Histogramme II : Stade VIII à 4 c. (nombre de mesures : 60).
Histogramme III : Stade IX à 8 c. (nombre de mesures : 74).

3. Étude de la différenciation des corps nucléaires en « anlages ».

1°) *Dosages cytophotométriques des « anlages » au cours de leur transformation.*

Des 8 corpuscules ainsi formés, 4 gonflent et se transforment en macronoyau : lors de leur différenciation, ils sont appelés corps nucléaires ou encore « anlages ». Des 4 restants : 3 dégénèrent et l'autre se divise en 2. Ce sont les futurs micronucleus des exconjugants-fils.

Stade 10 : ce stade présente le plus grand intérêt, car on assiste du début à la fin, à l'accroissement, c'est-à-dire à l'évolution et à la différenciation des 4 anlages diploïdes en macronucleus polyploïdes.

Ce stade est le plus long de toutes les étapes des remaniements nucléaires des phénomènes de la conjugaison. Sa durée est fonction du milieu nutritif et de la température. A température constante (25°), nous avons obtenu des exconjugants-fils 3 jours après le mélange, sur milieu au bouillon de laitue et 5 jours seulement après le croisement de 2 mating-types (la réaction d'agglomération suivie de la formation des couples étant immédiate), dans du milieu renfermant à volume égal du bouillon de blé et du milieu de laitue.

Dans nos conditions expérimentales, il faut attendre 5 jours après la formation des couples pour obtenir des exconjugants-fils. L'évolution des anlages a été suivie régulièrement tous les jours et le résultat des dosages cytophotométriques est consigné dans la Fig. 4, où sont représentés les histogrammes I, II, III et IV, correspondant respectivement aux prélèvements effectués aux deuxième, troisième, quatrième et cinquième jour après le mélange des mating-types V et VI.

Analysons successivement les différents histogrammes.

Histogramme I (Fig. 4).

74 % des teneurs en ADN sont comprises entre 30 et 40 u. a. Sur 62 anlages photométrés, les 3/4 sont encore à un stade diploïde comme les corpuscules dont ils sont issus. Il faut noter cependant dans une faible proportion, l'apparition d'une augmentation du taux des quantités d'ADN.

On peut conclure qu'entre la troisième division postzygotique (stade à 8 corpuscules) et le début de la transformation des corps nucléaires, il y a une période de repos assez longue, d'une durée approximative d'une journée dans nos conditions expérimentales, pendant laquelle aucune synthèse d'ADN n'a lieu.

Histogramme II (Fig. 4).

3 jours après le mélange, les teneurs en ADN des anlages ont augmenté. Les valeurs s'échelonnent pour nos 63 mesures entre 30 et 120 u. a. Seulement 2 % sont encore en phase diploïde.

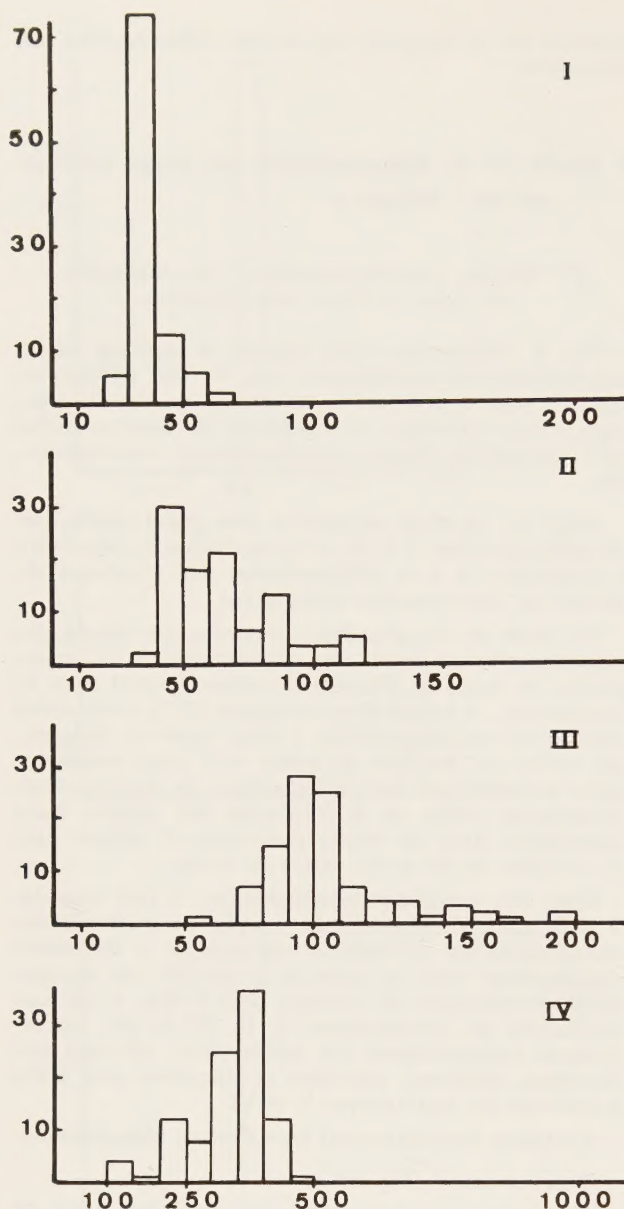


FIG. 4. — Etude de la teneur en ADN des anlages au cours du stade 10.

Histogramme I : 2 jours après le mélange (nombre de mesures : 62). *Histogramme II :* 3 jours après le mélange (nombre de mesures : 63). *Histogramme III :* 4 jours après le mélange (nombre de mesures : 72). *Histogramme IV :* 5 jours après le mélange (nombre de mesures : 72).

La quantité d'ADN par anlage, augmente progressivement et il ne semble pas que la valeur tétraploïde atteinte apparaisse comme un arrêt de synthèse ou une étape : il n'y a pas interruption, mais continuation au-delà.

A partir du début de la synthèse de l'ADN dans les anlages et jusqu'à la fin du stade 10, on assiste en examinant les histogrammes de la Fig. 4, à un déplacement graduel des valeurs plus faibles vers des valeurs plus fortes.

3 jours après le mélange de 2 mating-types, 30 % des anlages ont encore dans nos conditions d'expérience des quantités d'ADN comprises entre 40 et 50 u. a., alors que d'autres ont atteint 90 u. a. et 120 u. a.

Il semblerait donc que la synthèse de l'ADN des anlages commence entre le deuxième et le troisième jour après le mélange des 2 types complémentaires.

L'histogramme II présente en outre des pics qui montrent comment débute l'endomitose. Si on ajoute à la valeur diploïde 33,3 u. a. dans les corpuscules, une valeur diploïde : 17 u. a. On obitent les valeurs successives suivantes :
33,3 + 17 = *50,3* + 17 = *67,3* + 17 = *84,3* + 17 = *101,3* + 17 = *118,3,* etc...

Ces valeurs calculées correspondent justement aux pics observés sur l'histogramme. Cela apporterait la preuve de l'augmentation du taux d'ADN par valeurs haploïdes puisqu'on a des valeurs tri, tétra, penta, hexa et heptaploïdes.

A un stade plus avancé de la synthèse d'ADN, il est bien évident que ces unités haploïdes ne peuvent plus apparaître sur les histogrammes.

Histogramme III (Fig. 4).

4 jours après le mélange, les teneurs en ADN ont encore augmenté et les valeurs s'échelonnent à ce stade entre 50 et 200 u. a.

Histogramme IV (Fig. 4).

5 jours après le mélange, c'est la fin du stade 10. Bien que beaucoup d'exconjugants soient à peu près au même stade, il est impossible de savoir si la bipartition va avoir lieu lorsque le micronucleus ne s'est pas encore divisé. En conséquence, nous observons des anlages à un stade plus avancé que d'autres.

A la fin du stade 10, jamais on n'observe de valeurs supérieures à 480 u. a.

Le stade 10 correspondrait à une première phase de polyploïdisation.

Stade 11.

La première division cellulaire a eu lieu, répartissant ainsi 2 anlages dans chaque exconjugants-fils.

Les quantités d'ADN sont comprises entre 280 u. a. et 850 u. a. : histogramme I de la Fig. 5.

Les teneurs les plus élevées correspondraient à des anlages où la synthèse d'ADN est en voie d'achèvement. Comme des travaux récents nous ont montré qu'en phase G_1 les teneurs en ADN fluctuent entre 2 limites assez éloignées (inédit), on peut supposer que toutes les valeurs inférieures à 480 u. a., donc comprises entre 250 u. a. et 480 u. a. sont des anlages à l'état de repos.

Au cours de ce stade, il pourrait y avoir une phase de repos pour les 2 anlages, correspondant à la phase G_1 de l'interphase.

Stade 12.

On observe dans l'histogramme II de la Fig. 5, une similitude avec les histogrammes déjà obtenus pour les

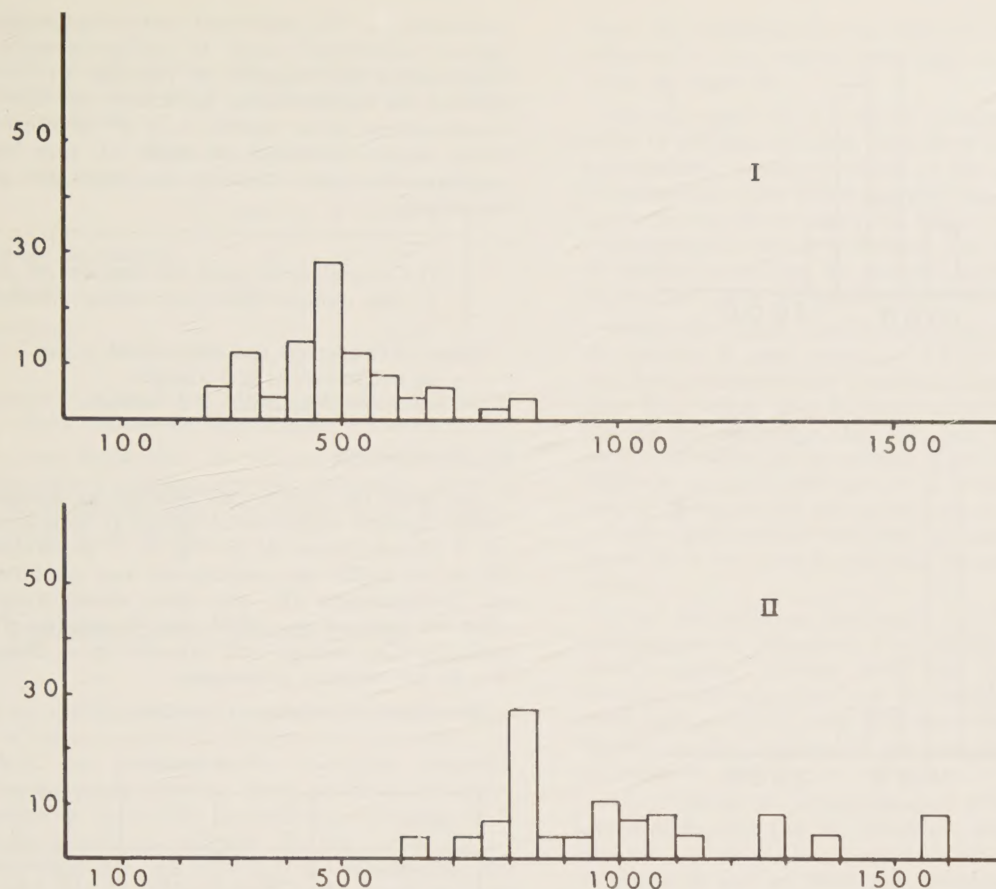


Fig. 5. — Détermination des teneurs en ADN des anlages chez les exconjugants-fils (2 anlages) et les exconjugants-petits-fils (1 anlage ou Mn).
Histograme I : (Stade 11 (nombre de mesures : 50). *Histogramme II :* Stade 12 (nombre de mesures : 38).

macronucleus d'une culture végétative en phase de croissance logarithmique.

La différenciation des corps nucléaires s'achève à la fin du stade 11, lorsqu'un anlage va être attribué à chacun des exconjugants petits-fils.

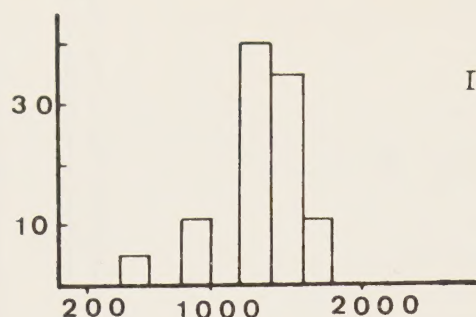
Les anlages à ce stade sont devenus l'équivalent des macronucleus.

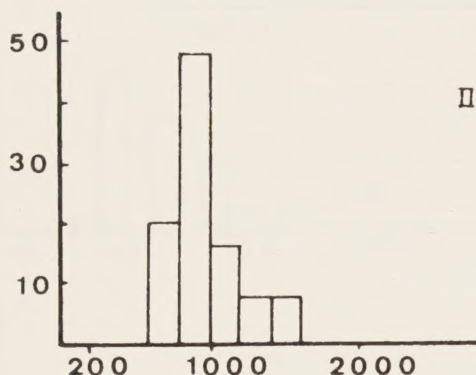
2) *Comparaison de la teneur globale d'ADN des anlages contenue dans la même cellule aux stades 10, 11 et 12*

Il nous semblait intéressant de comparer les quantités totales d'ADN contenu dans les anlages, à chacun des stades différents d'évolution. Les résultats des calculs, obtenus par addition des taux d'ADN des anlages dans chaque cellule, sont représentés par les 3 histogrammes de la Fig. 6.

L'histogramme I (Fig. 6) représentant la teneur totale des 4 anlages par exconjugant montre d'abord des valeurs faibles (400 à 600 u.a.). Celles-ci correspondraient à une endomitose encore précoce et inachevée. Les valeurs maximales observées sont de 1 800 u.a. et correspondent à un stade où la cellule va se diviser. A ce moment, les teneurs en ADN sont les équivalentes du double du pic obtenu dans l'histogramme II de cette même figure. Ceci semble logique puisque la cellule à 4 An se divise et ceux-ci sont répartis 2 à 2 dans chacun des exconjugants-fils. Il n'y aurait plus au stade 11, que la moitié de la teneur globale maxima précédente, donc 900 u.a. environ.

Les histogrammes II et III (Fig. 6) sont comparables entre eux. Dans les 2 cas, les teneurs en ADN des anlages s'échelonnent entre 600 et 1 600 u.a. et présentent un maximum vers 900 u.a. Or, nous savons que, dans une culture normale, ce pic représente la valeur moyenne en phase G_1. De ce fait, on pourrait conclure qu'aux stades 11 et 12, il y aurait une phase de repos pour les anlages (correspondant à la phase G_1 de l'interphase d'une cellule en croissance végétative), phase qui suivrait la division cellulaire et dont la moyenne du taux d'ADN serait de 900 u.a. dans ces conditions expérimentales. Il reste cependant à confirmer et à préciser la durée de cette période de repos.





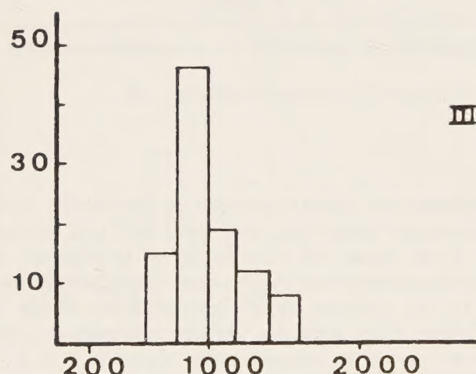


FIG. 6. — Comparaison des teneurs totales de l'ADN des anlages dans une Paramécie aux stades 10 - 11 et 12.
Histogramme I : Fin du stade 10. Exconjugants avec 4 A. *Histogramme II :* Stade 11. Exconjugants-fils avec 2 A. *Histogramme III :* Stade 12. Exconjugants-petits-fils avec 1 A.

Au stade 11, il y aurait seulement une augmentation du double du taux d'ADN dans chacun des 2 anlages. Nous pensons qu'il faudrait considérer ce stade comme un stade intermédiaire entre la fin de l'endomitose (stade 10) par augmentation de valeurs haploïdes et le stade définitif de la cellule. Au stade 11, aurait lieu un 2e phase de polyploïdisation.

Il semblerait que certaines substances cellulaires joueraient un rôle important comme inducteur ou inhibiteur, contrôlant ainsi la polyploïdisation puisque l'endomitose est stoppée au moment de la fin de la division du micronucleus. La teneur en ADN du futur macronucleus serait établie à la 1re division cellulaire. Cette teneur doublerait au stade 11, puis demeurerait approximativement constante au cours des générations successives.

3) *Comparaison entre les teneurs en ADN des anlages dans une même cellule*

Nous envisagerons successivement 2 cas :
— les exconjugants à 4 anlages;
— les exconjugants-fils à 2 anlages.

a) *Exconjugants.*

Au stade 10, nous avons effectué les dosages à intervalles réguliers toutes les 24 heures et nous avons obtenu les 4 histogrammes de la Fig. 4. C'est seulement à la fin de ce stade, qui correspond aux quantités d'ADN de l'histogramme IV, que nous avons comparé entre elles les teneurs en ADN des 4 anlages d'un même individu. Ces teneurs sont classées en 4 séries (1 - 2 - 3 - 4) par valeurs croissantes.

On obtient le tableau I suivant :

TABLEAU 1

Série	1	2	3	4
Nombre de mesures	18	18	18	18
La moyenne	299,48	321,12	338,36	363,24
L'écart-type	73,28	71,76	72,87	77,04

Afin d'avoir plus de précisions, nous avons comparé entre elles 2 à 2 chacune des 4 séries de mesures en appliquant le test t aux séries appariées. On obtient le résultat suivant :

Comparaison entre 1 et 2 : $t = 4,67$.
La différence est donc hautement significative. Comme les séries sont classées par teneurs croissantes d'ADN, la série 1 qui diffère de 2, diffère aussi de 3 et de 4.

Comparaison entre 2 et 3 : $t = 2,98$.

Comparaison entre 3 et 4 : $t = 7,25$.

En conclusion, la comparaison 2 à 2 des 4 séries de mesures correspondant aux 4 anlages d'une même cellule, par le test t appliqué aux séries appariées, nous a donné une valeur de t hautement significative au seuil 95 %.

Les teneurs en ADN des 4 anlages chez ces exconjugants sont différentes les unes des autres. L'endomitose se fait donc à vitesse différente pour les 4 anlages dans le cytoplasme d'un même exconjugant. On remarquera que les différences entre les valeurs d'ADN trouvées pour les anlages sont de l'ordre d'1, 2 et 3 fois le nombre d'unités haploïdes.

b) *Exconjugants-fils.*

A ce stade, il n'y a plus que 2 anlages par cellule et la comparaison des 2 séries de mesures nous a fourni les résultats suivants :

TABLEAU 2

	Série A	Série B
Nombre de mesures	25	25
Moyenne	456,61	516,62
Ecart-type	76,75	144,07

En appliquant le test *t* aux séries appariées, on obtient $t = 4{,}16$, valeur nettement significative au seuil 95 %.

Dans ce cas également, les teneurs en ADN des 2 anlages d'un même exconjugant sont différentes. Il n'y a donc pas de régulation vers une même valeur moyenne de cette teneur à ce stade.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Lors d'un mélange des 2 mating-types complémentaires de la même variété de *Paramecium caudatum,* les micronucleus qui présentent des réactivités sexuelles sont tous à un stade diploïde, donc en phase de repos G_1. La synthèse de l'ADN apparaît au moment où le micronucleus grossit et s'éloigne du Mn. Avant la 1re division prézygotique, les micronoyaux renferment une valeur double de la précédente. Après la 2e division prégamique, le taux moyen d'ADN observé est de 17,1 u.a. : ce taux a alors diminué de moitié. Au cours des 2 premières divisions prégamiques, il n'y a pas eu de synthèse d'ADN, la 2e division est bien réductionnelle et on observe chez ce Cilié le rapport 4 : 2 comme chez les Métazoaires. Nos résultats sont en accord avec ceux de Pieri (1965) chez *Stylonychia pustulata* au cours de la conjugaison.

Au cours du stade 4, le micronoyau restant augmente sur taux d'ADN : celui-ci double comme dans une mitose normale; puis, le micronoyau se divise (c'est la 3e division *prézygotique*) pour donner les 2 noyaux gamètes, dont le taux moyen d'ADN est de 17,3 u.a : les pronucleus ♂ et ♀ sont donc haploïdes et on a le rapport 1 : 2 : 1.

Après la formation du syncaryon, au cours des divisions postzygotiques, les corpuscules se comportent comme des micronucleus. On observe le rapport 4 : 2. Quatre des 8 corpuscules une fois formés restent dans une longue phase de repos avant de commencer à synthétiser de l'ADN.

A ce stade, ils ont tous le même taux d'ADN qui correspond aux valeurs diploïdes des micronucleus normaux. Comme chez *Stylonychia mytilus* (Ammermann 1965), les anlages sont diploïdes avant leur développement.

La différenciation des anlages se ferait en 2 phases successives. Au cours de la 1re, qui a lieu exclusivement chez les exconjugants, on observe une augmentation progressive par valeurs haploïdes du taux d'ADN au cours du stade 10.

D'autre part, il n'y aurait aucune synchronisation entre la synthèse d'ADN dans les 4 anlages d'un même exconjugant, comme le montrent les calculs statistiques; s'expliquerait ainsi l'hétérogénéité des teneurs en ADN observées en fin du stade 10. Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne sommes pas encore en mesure de préciser quels sont les facteurs qui interviennent pour déterminer l'arrêt de l'endomitose chez les exconjugants.

Seule une étude autoradiographique nous permettra de préciser si cette synthèse d'ADN dans les anlages une fois commencée est continue, comme l'a fait remarquer Rao (1968) chez *Euplotes woodruffi* par des expériences de marquage. Le fait que les moyennes des valeurs d'ADN des 4 anlages d'un même exconjugant diffèrent pour un multiple de la valeur haploïde est à retenir. Il ne permet pas cependant de dire si toutes les « unités génétiques » subissent la polyténie semblablement ou si les unes la subissent beaucoup plus que les autres.

Chez *Paramecium caudatum,* les 2 phases de polyploïdisation se déroulent l'une après l'autre, mais pas dans le même individu. Elles sont séparées par la 1re division cellulaire qui suit la conjugaison, alors que chez *Stylonychia mytilus* (Ammermann 1965), le développement des anlages en macronucleus est achevé au moment de celle-ci.

La 2e phase de polyploïdisation a lieu donc dans les exconjugants-fils qui ne possèdent plus que 2 anlages chacun. A ce stade, l'augmentation du taux d'ADN continue et elle se ferait par doublement de la valeur initiale. La vitesse de synthèse demeurerait indépendante dans chacun des 2 anlages. Ce stade serait une phase transitoire où s'achèverait la différenciation des anlages et où seraient établies les quantités d'ADN des macronucleus au moment de la répartition de chacun d'eux dans les exconjugants-petits-fils.

Rappelons que Raikov (1964) a prouvé, chez *Nassulopsis élegans* que les bandes chromatiques du macronoyau, au cours de la division nucléaire, sont des agrégats de chromosomes et que la duplication de l'ADN se produit non pas durant l'endométaphase-endoanaphase, mais bien avant et durant un temps très court entre les deux divisions cellulaires. Ceci correspond à ce que nous avons signalé dans les modifications ultrastructurales des « anlage » où les plaques chromatiques n'apparaissent qu'après la duplication de l'ADN (de Puytorac et Blanc, 1967).

Rappelons aussi que nous avons déjà démontré (Blanc, 1968) par cytophotométrie que le Mn des conjugants est le siège d'une synthèse active d'ADN. Nous confirmons ailleurs, par autoradiographie, que cette activité autocatalytique du macronoyau, jusqu'alors insoupçonnée, se poursuit encore bien après la fragmentation du noyau.

Jusqu'à ce jour, très peu de recherches par les méthodes cytophotométriques ont été envisagées pour l'étude de l'appareil nucléaire au cours des différents stades de la conjugaison des Ciliés. L'étude de la polyploïdisation en spectrophotométrie par Ammermann (1965) a

montré des résultats qui diffèrent en certains points de ceux que nous avons obtenus chez *P. caudatum*. Ce fait n'est pas surprenant car les Ciliés considérés appartiennent à des groupes très différents.

BIBLIOGRAPHIE

Ammermann D. (1965). — Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus*. *Arch. Protistenk.*, **108**, p. 109-152.

Ammermann D. (1968). — Synthese und Abbau der Nucleinsaüren während der Entwicklung des Makronukleus von *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma*, **25**, p. 107-120.

Blanc J. (1965). — Etude cytophotométrique des périodes de duplication de l'ADN dans l'appareil nucléaire de *Paramecium caudatum*. *Protistologica*, **1**, fasc. 2, p. 11-15.

Blanc J. (1968). — Détermination par cytophotométrie des teneurs en ADN des macronucleus de *Paramecium caudatum* au cours des premières phases de la conjugaison. *Protistologica*, **4**, fasc. 3, p. 415-418.

Genermont J. (1962). — La génétique des Ciliés. *Rev. des questions scientifiques* du 20-1-1962, p. 38-80.

Golikowa M. N. (1965). — Der Aufbau der Kernapparates und die Verteilung der Nucleinsäuren und Proteine bei *Nyctotherus cordiformis* Stein. *Arch. Protistenk.*, **108**, p. 191-216.

Golikowa M. N. and Nilova V. K. (1967). — On DNA synthesis in the macronuclear anlage of *Nyctotherus cordiformis* Stein. *Cytology*, vol. 9, n° 4, p. 465-469.

Piéri J. (1965). — Interprétation cytophotométrique des phénomènes nucléaires au cours de la conjugaison chez *Stylonychia pustulata*. *C. R. Ac. Sc.*, **261**, p. 2742-2744.

de Puytorac P. et Blanc J. (1967). — Observations sur les modifications ultrastructurales des micronoyaux au cours de leurs transformations en macronoyaux chez *Paramecium caudatum*. *C. R. Soc. Biol.*, **161**, p. 297-302.

Raikov I. B. (1964). — DNA content of the nuclei and nature of macronuclear chromatin stranch of the ciliate *Nassulopsis elegans* (Ehrbg). *Acta Protozool.*, **2** (34), p. 339-355.

Rao M. V. N. (1968). — Macronuclear development in *Euplotes woodruffi* gollowing conjugation. *Exp. Cell. Res.*, **49**, p. 411-419.

Vivier E. (1960). — Contribution à l'étude de la conjugaison chez *Paramecium caudatum*. *Ann. Soc. nat. Zool. biol. anim.*, **12**, p. 387-506.

IMPRIMERIE LOUIS JEAN - GAP